



# Identificación de variantes zoonóticas de *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterocytozoon* en terneros de la provincia de Buenos Aires, Argentina

Tesina  
para optar por el título de  
Magíster en Biología Molecular Médica  
Universidad de Buenos Aires

Tesista: **Dra. Del Coco, Valeria Fernanda**

Centro de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos – Facultad de Ciencias  
Médicas - UNLP

Investigadora Asistente de CONICET

Directora: **Dra. Santín Durán, Mónica**

Environmental Microbial and Food Safety Laboratory  
Agricultural Research Service  
U.S. Department of Agriculture  
Beltsville, Maryland, USA

Co-directora: **Dra. Córdoba, María Alejandra**

Centro de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos – Facultad de Ciencias  
Médicas - UNLP

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

2016

# INTRODUCCIÓN

Las zoonosis engloban a todas las enfermedades comunes y transmisibles entre animales y humanos y constituyen una importante causa de morbilidad en todo el mundo generando grandes pérdidas económicas en los países en desarrollo. Estas representan la mayor parte de las enfermedades emergentes y reemergentes que preocupan a las autoridades sanitarias a nivel mundial. El concepto de zoonosis emergentes se refiere a enfermedades transmitidas por animales cuya incidencia se ha incrementado en los últimos tiempos o bien son causadas por nuevos agentes infecciosos. El incremento y dispersión de las mismas indican que en un futuro cercano comprometerán a un gran número de personas. Distintos elementos contribuyen a la aparición de nuevas enfermedades zoonóticas; el cambio climático global, la concentración demográfica urbana, el aumento de la tenencia de animales de compañía, cambios en los sistemas de producción animal, migraciones, incremento del comercio internacional; modificaciones, resistencia y mutaciones en el genoma de los microorganismos, entre otras (Torgerson & MacPherson, 2011).

El impacto de una enfermedad en la sociedad está relacionado con su costo financiero y la morbimortalidad asociada, entre otros indicadores. En términos económicos, las zoonosis causan importantes pérdidas en la salud humana y animal (Torgerson & MacPherson, 2011). El desarrollo tecnológico en el campo de la epidemiología molecular ha permitido la identificación de un considerable número de microorganismos con potencial zoonótico y, en

muchos casos, con un creciente y constante aumento del rango de hospedador (Thompson *et al.*, 2008).

Los animales silvestres y domésticos, incluyendo el ganado, constituyen reservorios de microorganismos que pueden infectar al hombre. Desde una perspectiva económica, cultural e histórica, la industria ganadera representa a nivel económico uno de los sistemas de producción más importantes de Argentina. En 2005 existían en nuestro país alrededor de 56 millones de cabezas de ganado (6 % de las cuales estaban destinadas a la producción de lácteos y 94 % a carne vacuna) distribuidos en 213,706 campos (Aznar *et al.*, 2011).

La región central o "Pampeana" alberga alrededor de 30 millones de cabezas de ganado. Esta presenta una llanura de pastizales y suelo rico en materia orgánica, con un clima templado de 16 °C de temperatura media y precipitación media de 900 mm. Debido a sus características geográficas y climatológicas la provincia de Buenos Aires tiene la densidad de población humana más alta en todo el país (INDEC, 2010) .

Cuando el desarrollo de la industria ganadera no está acompañado de adecuadas medidas de prevención, el ganado vacuno puede convertirse en una fuente de infección de agentes zoonóticos (Del Coco *et al.*, 2008; Santín & Fayer, 2011; Santín *et al.*, 2011). Un incorrecto manejo de estos animales y sus desechos pueden ser el punto de partida para la dispersión ambiental de patógenos que generen riesgos para la salud humana y animal. El agua puede transformarse en un importante vehículo de transmisión de microorganismos a partir de lluvias, riego o pastoreo lindero a arroyos, ríos o lagos. Estos microorganismos dependiendo de su grado de resistencia a condiciones

adversas y procesos de desinfección, podrán conservar su viabilidad hasta alcanzar un nuevo hospedador (Jagai *et al.*, 2010).

Los parásitos zoonóticos transmitidos por el agua presentan distribución mundial y están relacionados con formas endémicas y epidémicas de las infecciones que se producen tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud, estos agentes constituyen una de las causas de los 4 billones de casos de diarrea reportados anualmente, siendo responsables del 21% de las defunciones en niños menores de 5 años (Baldursson & Karanis, 2011). Un gran número de parásitos zoonóticos están asociados a diarrea cuya gravedad dependerá del inóculo infectivo y del estado inmune del hospedador. Esto es importante teniendo en cuenta que en los últimos 30 años se ha observado un notable incremento de pacientes con compromiso de la inmunidad (infección por VIH-SIDA, tratamientos inmunosupresores, aumento de la expectativa de vida, malnutrición calórica proteica, entre otras), en quienes los agentes productores de infección gastrointestinal pueden desencadenar cuadros clínicos con gran morbilidad asociada (Thompson *et al.*, 2008).

Este escenario epidemiológico ha permitido la emergencia de parásitos entéricos de los géneros *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterocytozoon*, entre otros, los cuales se transmiten a partir de las heces de un gran rango de hospedadores incluyendo animales y humanos. Estos parásitos incluyen distintas especies, genotipos, y subtipos que exhiben una amplia diversidad biológica, difiriendo en su habilidad para infectar múltiples especies de hospedadores (Xiao & Ryan, 2008; Santín & Fayer, 2011; Vassalos *et al.*, 2008). Las infecciones por estos agentes son comunes en humanos, animales

de granja, domésticos y silvestres (Thompson, 2004; Santín & Fayer, 2011; Thompson & Smith, 2011). Un importante aspecto de la epidemiología de la infección por estos parásitos es conocer el rango de hospedador de las diferentes especies y variantes genéticas, la forma en la que se mantienen en la naturaleza y el potencial para la transmisión cruzada y factores de riesgo asociados. Esto es de particular importancia para poder determinar su potencial zoonótico e importancia en Salud Pública (Thompson *et al.*, 2008). El impacto clínico de la infección por parásitos entéricos es mayor en los países en vías de desarrollo, donde las inadecuadas medidas sanitarias, pobre higiene, inapropiados tratamientos de potabilización agua y la proximidad a reservorios zoonóticos, particularmente animales de compañía y ganado, son mayores. En tal sentido, la posibilidad que un hospedador sea infectado en un mismo momento por más de una especie parasitaria aumenta (Thompson *et al.*, 2008; Baldursson & Karanis, 2011).

El género *Cryptosporidium* incluye 27 especies validadas que afectan a peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Xiao & Ryan, 2015; Holubova *et al.*, 2016). *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum* son las principales especies responsables de los casos endémicos y epidémicos de criptosporidiosis en humanos (Xiao, 2010). *Cryptosporidium hominis* infecta casi de forma exclusiva a humanos mientras *C. parvum* no solo afecta a humanos sino que tiene un amplio rango de hospedadores y se considera tiene potencial zoonótico. Usando técnicas de subgenotipado se han podido identificar hasta 50 subtipos de acuerdo al locus que codifica para la glicoproteína de superficie GP60, de los cuales los subtipos en las familias IIa y IIc exhiben la mayor capacidad zoonótica (Plutzer & Karanis, 2009). Un importante reservorio de *C.*

*parvum* son los terneros menores de dos meses en los que se han hallado prevalencias puntuales desde 12 y 100% a nivel mundial, según las características particulares de muestreo y diagnóstico implementados en cada estudio (Santín & Trout, 2008). Dado el amplio desarrollo de la actividad ganadera en Argentina, nuestro país presenta una gran densidad de terneros, lo cual sugiere un elevado nivel de contaminación potencial del agua de consumo con ooquistes de *C. parvum*. Diferentes estudios han demostrado que los terneros se ven habitualmente infectados por distintas variantes del subtipo Ila, habitualmente zoonóticas, que varían según el área geográfica (Ng *et al.*, 2008).

La prevalencia estimada de *Cryptosporidium* en personas con diarrea es de 1 a 3% en países desarrollados y alrededor del 10% en países en vías de desarrollo (Del Coco y Córdoba, 2016). A nivel mundial, más de 45 brotes de criptosporidiosis transmitidos por el agua han sido informados en las últimas décadas (Cacciò & Pozio, 2006). El brote de criptosporidiosis ocurrido en el año 1993 en Milwaukee, Estados Unidos, ha sido reconocido como uno de los más importantes en relación al consumo de agua contaminada afectando a más de 400.000 personas (Mac Kenzie *et al.*, 1994). La presencia del parásito en aguas subterráneas de abastecimiento poblacional y en aguas de superficie fue constatada en la provincia de Santa Fe, Argentina por Abramovich y col. (1996, 2001).

*Blastocystis* sp. es un parásito intestinal ampliamente diseminado a nivel mundial, con gran rango de hospedadores (Vassalos *et al.*, 2008). Presenta una gran heterogeneidad genética y al momento se han identificado 17 subtipos diferentes basados en el polimorfismo del gen de la pequeña

subunidad del DNA ribosomal (Stensvold, 2015). Tiene baja especificidad de hospedador y es considerado un patógeno con potencial zoonótico, debido a que las infecciones en humanos han sido asociadas a contacto directo con cerdos, primates y aves de corral, o bien indirecto a través de agua y alimentos contaminados (Córdoba y Del Coco, 2016). Estudios recientes han identificado al ganado vacuno como hospedador de *Blastocystis* (Santín *et al.*, 2011).

La prevalencia de *Blastocystis* en humanos muestra una gran variabilidad; Japón y Singapur presentaron bajas tasas de infección (menores a 5%), Estados Unidos ha reportado valores cercanos a 10%, mientras que numerosos países como Argentina, Brasil, Cuba, Egipto, Emiratos Árabes, Indonesia, Irak, Líbano, Malasia, México, Tailandia y Venezuela indicaron frecuencias superiores a 20% (Del Coco y col., 2016).

Si bien su capacidad patógena es motivo de debate y sus mecanismos de daño no han sido bien descritos, la blastocistosis en humanos suele estar asociada con sintomatología no patognomónica como malestar abdominal, dolor, diarrea y constipación (Vassalos *et al.*, 2008). Ciertas poblaciones pueden ser más susceptibles a adquirir la infección y desarrollar sintomatología como los individuos inmunocomprometidos (infección por VIH/SIDA, transplantados y uso de drogas inmunosupresoras). Las condiciones socioeconómicas, la calidad del agua de bebida, el consumo de alimentos contaminados y la higiene personal deficiente, son los principales factores de riesgo asociados a la infección tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Asimismo, los individuos que se encuentran en estrecho contacto con animales también constituyen una población de riesgo (Vassalos *et al.*, 2008).

*Enterocytozoon bieneusi* es un organismo eucariota recientemente relacionado al reino Fungi, que presenta distribución ubicua y amplio rango de hospedador (Santin & Fayer, 2011). Dentro de los microsporidios, *Enterocytozoon bieneusi* es la especie que se asocia con mayor frecuencia a enfermedad en el humano, produciendo infección gastrointestinal con gran frecuencia en pacientes con infección por VIH-SIDA, especialmente en países en vías de desarrollo con limitado acceso a la terapia antirretroviral (Velasquez *et al.*, 2000, 2005). *Enterocytozoon bieneusi* ha sido descrito en humanos, cerdos, vacas, caballos, perros, gatos, pájaros entre otros hospedadores (Santin & Fayer, 2011). Las esporas de este agente se han hallado en el agua y se presume que ésta es una posible fuente de infección para el humano, además del contacto directo con animales infectados y con comida contaminada (Didier *et al.*, 2004; Decraene *et al.*, 2012). Sus vías de transmisión, reservorios y otros aspectos epidemiológicos han sido poco estudiados. En base a polimorfismos de nucleótidos en la secuencia de la región espaciadora interna de su ARNr, diferentes genotipos se han descrito en los últimos años, pero su importancia biológica y epidemiológica es todavía desconocida. Algunos de esos genotipos tienen un rango de hospedadores restringido pero otros tienen un amplio rango que incluye en ocasiones humanos y animales. Genotipos con potencial zoonótico han sido hallados en heces de ganado vacuno (Santín & Fayer, 2011). En Brasil, da Silva Fiuza *et al.* (2016) han reportado la presencia de este microorganismo en ganado vacuno de carne y leche.

Debido a la habilidad de *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterocytozoon* de infectar distintos hospedadores y la presencia ubicua de sus elementos



infectivos, los humanos pueden adquirir la infección por estos agentes a través de varias rutas de transmisión, tales como contacto directo con personas infectadas (transmisión persona a persona) o animales (transmisión zoonótica) e ingestión de agua o alimentos contaminados (Del Coco y col. 2009; Thompson & Smith, 2011).

Los datos epidemiológicos existentes en nuestro país acerca de estos parásitos impiden al momento conocer variantes genéticas en sus distintos reservorios y las relaciones existentes entre los mismos. El uso de herramientas aplicadas a la epidemiología molecular permitirá mejorar significativamente el conocimiento de la transmisión de estos parásitos entéricos en humanos y animales de nuestra región.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar la epidemiología de *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterocytozoon* en muestras de materia fecal de terneros de la provincia de Buenos Aires.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la frecuencia de *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterozytozoon* en materia fecal de terneros de la provincia de Buenos Aires.
2. Identificar los genotipos y/o subtipos zoonóticos de *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterocytozoon* presentes en la materia fecal de terneros de la provincia de Buenos Aires.



De cada animal se obtuvo una única muestra de materia fecal por tacto rectal utilizando guantes de látex estériles, la cual se colectó en recipiente plástico individual. Las muestras fueron remitidas al laboratorio y conservadas en fresco a 4 °C hasta su análisis.

## *2. Extracción de ADN*

Las muestras de materia fecal fueron concentradas y purificadas por gradiente discontinuo de sacarosa modificado (Del Coco, 2012). Se realizó la extracción de ADN total empleando un kit DNeasy Tissue (Qiagen®, Valencia, CA). Se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante con ligeras modificaciones (Fayer *et al.*, 2010). A una alícuota de 100 microlitros (µl) de cada muestra, se adicionaron 180 µl de buffer ATL. Se incorporaron 20 µl de Proteinasa K y tras homogeneización con vórtex, la solución se incubó a 55°C durante toda la noche. La solución se vorteoó por 15'' y se adicionaron 200 µl de buffer AL; luego de homogeneización con vórtex, se incubó a 70°C durante 10'. Se adicionaron 200 µl de etanol (96-100%), la muestra se mezcló con vortex y se colocó en una mini columna DNeasy dentro de un tubo colector. La muestra se centrifugó a 8000 RPM por 1'; luego, el sobrenadante y el tubo colector se descartaron. La mini columna DNeasy se colocó en un nuevo tubo colector, y se adicionaron 500 µl de buffer AW1. La solución se centrifugó por 1' a 8000 RPM; el sobrenadante y el tubo colector ser descartaron. La mini columna DNeasy se colocó en un nuevo tubo colector, y se le adicionaron 500 µl de buffer AW2; la muestra se centrifugó por 3' a 14000 RPM para secar la membrana DNeasy. Se descartaron el sobrenadante y el tubo colector. Finalmente, la mini columna DNeasy se colocó en un tubo de microcentrífuga

de 1.5 ml, y 100 µl de buffer AE se incluyeron directamente sobre la membrana DNeasy. La muestra se incubó a temperatura ambiente por 1', se centrifugó por 1' a 8000 RPM y posteriormente se conservó a -20 °C para su estudio genómico.

### 3. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificación de Cryptosporidium, Blastocystis y Enterocytozoon bienersi*

#### a. 1. Identificación de *Cryptosporidium* spp.

Se utilizó un protocolo de nested PCR en 2 tiempos para amplificar un fragmento de 830 pb del gen ARNr 18S usando primers 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' y 5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3' para la primer PCR, y 5'-GGAAGGGTTGTATTT-ATTAGATAAAG-3' y 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' para la segunda PCR (Xiao *et al.* 1999). La master mix de la primer PCR se conformó de la siguiente manera: 3 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM de deoxidonucleótidos trifosfato (dNTP), 2,5 U de enzima Taq polimerasa (Qbiogene, Irvine, California), 2,5 µl solución de albúmina sérica bovina (BSA) (0,1g/10 ml), y 1 µM de cada primer forward y reverse en un volumen de reacción de 50 µl.

Cada uno de los 35 ciclos consistió en 94° C durante 45'', 59 °C durante 45'', y 72 °C durante 1' luego de iniciar a 94 °C por 3' y finalizar con 72 ° C por 7'.

La master mix de la segunda PCR fue idéntica a excepción de una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1.5 mM.

Para la segunda ronda de PCR, cada uno de los 40 ciclos consistió de 94 °C por 30'', 58 °C por 90'', y 72 °C por 2' luego de un inicio a 94°C por 3' y un final a 72 °C por 7'.

#### a.2. Subtipificación de *C. parvum*

Se utilizó un protocolo de nested PCR para amplificar un fragmento de 450 bp del gen de la glicoproteína de 60kDa (GP60) (Sulaiman *et al.*, 2005).

Tanto para la primera como la segunda ronda de PCR primaria y secundaria, la master mix contenía buffer 1x, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 2,5 U de Taq (Qbiogene, Irvine, California), 2,5 l de BSA (0,1 g / 10 ml) y 1 mM de cada primer forward y reverse, en un volumen de reacción de 50 µl. Cada uno de 35 ciclos consistió en 94° C durante 45'', 50° C durante 45'', y 72° C durante 1', tras un calentamiento a 94° C durante 5' y una elongación con 72° C durante 10'.

#### b. Identificación de *Enterocytozoon bieneusi*

Se amplificó un fragmento de 400 pb correspondiente a la región completa de ITS y porciones de ambas regiones flanqueantes, subunidades mayor y menor del rDNA utilizando primers externos para la primer ronda de PCR: EBITS3 (5' 'GGTCATAGGGATGAAGAG 3') y EBITS4 (5' 'TTCGAGTTCTTTTCGCGCTC 3'), y primers internos para la segunda ronda, EBITS1 (5' 'GCTCTGAATATCTATGGCT 3') y EBITS2.4 (5' 'ATCGCCGACGGATCCAAGTG 3') (Buckholt *et al.* 2002).

La master mix contenía 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (PH9), 0,2 mM de dNTPs, 50 pmol de cada primer, 2,5 U de Taq

(Qbiogene Inc., Carlsbad, California), y 2,5 µL de BSA (0,1 g/10 ml), en un volumen final de 50 µl.

Tras un ciclo de desnaturalización a 94 ° C durante 3', la primera reacción de PCR constó de 35 ciclos de amplificación (a 94 ° C durante 30'', a 57 ° C durante 30'', y elongación a 72° C durante 40''), seguido de una extensión final a 72 ° C durante 10'. Las condiciones para la segunda PCR fueron idénticas, a excepción que los 30 ciclos se llevaron a cabo a una temperatura de hibridación de 55° C.

#### c. Identificación de *Blastocystis*

Para amplificar un fragmento de 479 pb del gen SSU rDNA, se utilizaron los primers forward Blast 505–532 (5'GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3') y reverse Blast 998–1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3') (Santín *et al.*, 2011).

Para un volumen de reacción final de 50-µl, la master mix contuvo buffer1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 2,5 U Taq (Qbiogene, Irvine, CA), 2,5 µl BSA (0.1 g/10 ml), y 1 µM de cada primer. La reacción de PCR constó de 35 ciclos, cada uno de los cuales fue a 95° C por 30'', 54° C por 30'', y 72° C por 30'', con un paso inicial de precalentamiento a 95° C por 4' y una extensión final de 72° C por 5'.

#### 4. Visualización de los productos de PCR

Una vez llevada a cabo la amplificación genómica en cada caso, los productos de PCR se analizaron mediante tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1%.

## Objetivo 2

Identificar los genotipos y/o subtipos zoonóticos de *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterozytozoon* presentes en la materia fecal de terneros de la provincia de Buenos Aires.

### 1. Secuenciación de muestras positivas y análisis filogenético

Las muestras positivas para los parásitos en estudio fueron secuenciadas. Se purificaron los productos de PCR usando las enzimas presentes en EXO-SAP (USB Corporation, Cleveland, Ohio) y posteriormente se secuenciaron en ambas direcciones utilizando Big Dye v3.1 y el analizador de secuencias ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, California). Los cromatogramas de las secuencias de cada hebra se alinearon y se analizaron mediante software Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin). Las secuencias se compararon con aquellas disponibles en base de datos de GenBank mediante análisis BLAST para confirmar su identidad. Se llevó a cabo el análisis filogenético y de evolución molecular mediante el software MEGA 4. La inferencia filogenética se realizó mediante el método de neighbor-joining. La distancia genética se calculó con el modelo de dos parámetros de Kimura.

En el caso de *C. parvum*, los subtipos dentro de la familia Ila difieren entre si por el número de secuencias repetidas en tandem de los tripletes TCA/TCG/TCT (codificantes de serina) en el extremo 5'. Además, los subtipos presentan una o dos copias de la secuencia ACATCA inmediatamente tras los tripletes repetidos.

## **2. Análisis estadístico**

Para establecer asociación entre genotipos/subtipos hallados y su localización geográfica, se efectuó análisis estadístico con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Science) para Windows, versión 11.5, 2002. Las diferencias entre proporciones se calcularon mediante la prueba de chi-cuadrado para valores de  $p < 0,05$  .



## RESULTADOS

### a. Frecuencia de infección e identificación de variantes zoonóticas de *Cryptosporidium* spp.

De las 209 muestras analizadas, 87 resultaron positivas para el género *Cryptosporidium* (frecuencia de infección: 41,62%). *Cryptosporidium parvum* fue la especie más frecuente detectada en 86 animales mientras que *Cryptosporidium bovis* fue detectado en una única muestra. En la figura 1 se observa la distribución de las muestras positivas por *C. parvum* por municipio.

Se obtuvieron un total de 75 secuencias válidas usando la GP60 para la determinación de subtipos. Los resultados se indican en la tabla 1. Se identificaron 7 subtipos pertenecientes a la familia zoonótica IIa: IIaA16G1R1 (n= 4), IIaA18G1R1 (n=13), IIaA19G1R1 (n= 1), IIaA20G1R1 (n= 27), IIaA21G1R1 (n=10), IIaA22G1R1 (n= 16), IIaA23G1R1 (n=4). En dos muestras se detectó infección mixta con 2 subtipos (IIaA21G1R1 y IIaA22G1R1).

El análisis estadístico mostró asociación significativa entre subtipos de *C. parvum* y localización geográfica ( $\chi^2 = 122.48$  ;  $p < 0,05$  ). Los subtipos IIaA16G1R1, IIaA19G1R1 y IIaA23G1R1 se circunscribieron a un solo municipio, General Lamadrid, Azul, y Tandil, respectivamente. Los subtipos IIaA22G1R1 y IIaA20G1R1, los cuales fueron hallados con mayor frecuencia, presentaron la distribución geográfica más amplia hallándose en 9 y 7 de los 12 municipios muestreados, respectivamente.

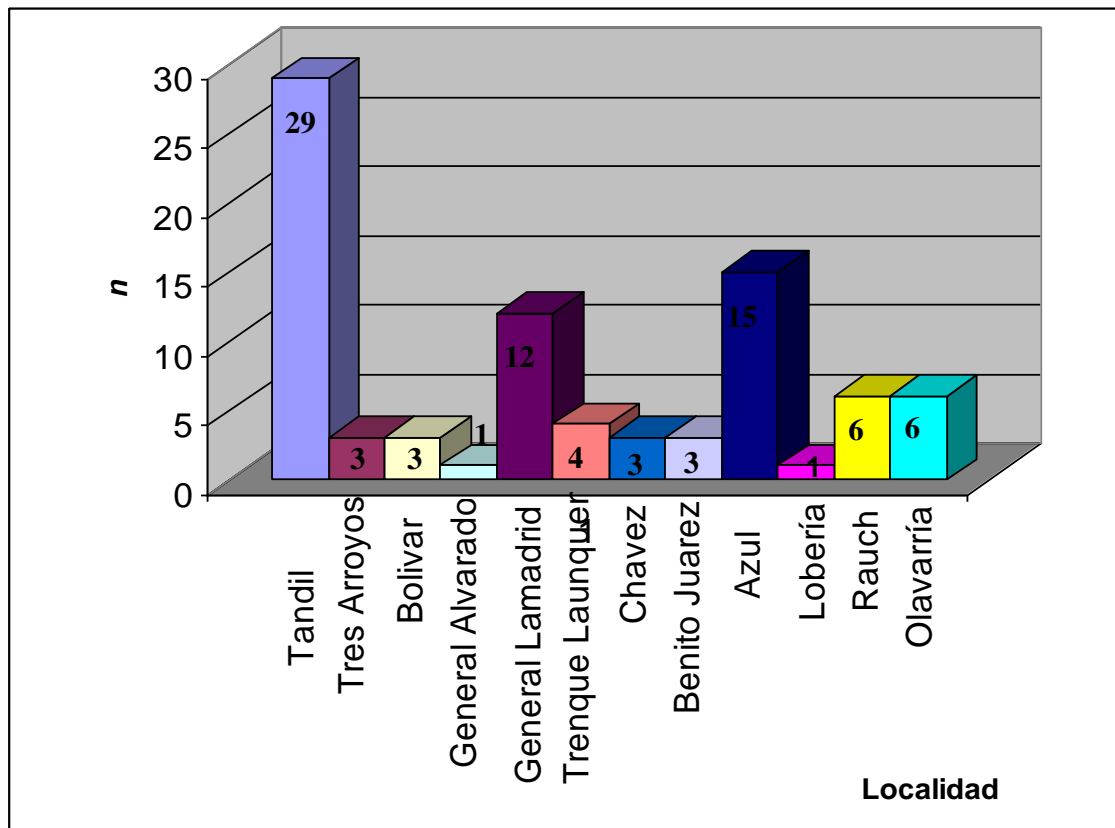


Figura 1. Frecuencia de distribución de muestras de materia fecal positivas para *Cryptosporidium parvum* en terneros de 12 municipios de la Cuenca Mar y Sierras, Provincia de Buenos Aires, año 2011-2013.

<b>Municipio (Numero de muestras secuenciadas)</b>	<b>Subtipos de <i>C. parvum</i></b>
Tandil (n=20)	IlaA18G1R1 (n=4) IlaA20G1R1 (n=6) IlaA21G1R1 (n=4) IlaA22G1R1 (n=2) IlaA23G1R1 (n=4)
Tres Arroyos (n=3)	IlaA18G1R1 (n=1) IlaA20G1R1 (n=1) IlaA22G1R1 (n=1)
Bolivar (n=3)	IlaA22G1R1 (n=2)
General Alvarado (n=1)	IlaA22G1R1 (n=1)
General Lamadrid (n=12)	IlaA16G1R1 (n=4) IlaA18G1R1 (n=1) IlaA20G1R1 (n=5) IlaA21G1R1 (n=1) IlaA22G1R1 (n=1)
Trenque Launquen (n=5)	IlaA21G1R1 (n=1) IlaA22G1R1 (n=4)
Chavez (n=3)	IlaA18G1R1 (n=3)
Benito Juarez (n=3)	IlaA20G1R1 (n=1) IlaA21G1R1 (n=2)
Azul (n=15)	IlaA18G1R1 (n=3) IlaA19G1R1 (n=1) IlaA20G1R1 (n=7) IlaA21G1R1 (n=2) IlaA22G1R1 (n=2)
Lobería (n=1)	IlaA18G1R1 (n=1)
Rauch (n=6)	IlaA20G1R1 (n=4) IlaA22G1R1 (n=2)
Olavarría (n=4)	IlaA20G1R1 (n=3) IlaA22G1R1 (n=1)
TOTAL (n=75)	IlaA16G1R1 (n= 4), IlaA18G1R1 (n=13), IlaA19G1R1 (n= 1), IlaA20G1R1 (n= 27), IlaA21G1R1 (n=10), IlaA22G1R1 (n= 16), IlaA23G1R1 (n=4)

Tabla 1. Distribución de subtipos de *Cryptosporidium parvum* en terneros de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

**b. Frecuencia de infección e identificación de variantes zoonóticas de *Enterocytoozoon bieneusi***

La frecuencia de *E. bieneusi* fue del 4,8% (10/209). Las muestras positivas fueron secuenciadas y en todos los casos fueron identificados los genotipos presentes en base a la secuencia de la región ITS.

El análisis de las secuencias reveló la presencia de 6 genotipos distintos, 4 previamente reportados en terneros (D, I, J y BEB4), 1 reportado en terneros por primera vez (EbpC) y un nuevo genotipo (BEB10), el cual presenta 1 nucleótido de diferencia en la región ITS respecto al genotipo CHN5 encontrado en perros de China (Zhang *et al.*, 2011). El genotipo más prevalente fue el J (4 muestras), seguido del I (2 muestras). No se detectaron infecciones mixtas (ver tabla 2).

Con respecto a la relación entre genotipos de *E. bieneusi* y localización geográfica, el análisis estadístico no evidenció asociación significativa entre variables.

Municipio	Genotipos encontrados
Tandil (n=1)	BEB4 (1)
Tres arroyos (n=2)	I (1) J (1)
Gral Lamadrid (n=1)	BEB10 (1)
Gral Pueyrredon (n=1)	EbpC (1)
Lobería (n=1)	I (1)
Rauch (n=2)	D (1) J (2)
Olavarría (n=1)	J (1)
Total (n=9)	BEB4 (1), BEB10 (1), I (2), J (4), EbpC (1), BEB10 (1)

Tabla 2. Distribución de genotipos de *E. bieneusi* en terneros de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

**c. Frecuencia de infección e identificación de variantes zoonóticas de *Blastocystis***

Con respecto a *Blastocystis*, ninguna de las muestras estudiadas resultó positiva para este parásito.

**d. Coinfección *Cryptosporidium* – *Enterocytozoon bieneusi***

En seis muestras se ha detectado coinfección por *Cryptosporidium* y *E. bieneusi*. En la tabla 3 se observan estas coinfecciones distribuidas por municipio.

Municipio	<i>Cryptosporidium</i>	Genotipo de <i>E. bieneusi</i>
Rauch	<i>C. bovis</i>	J
	<i>C. parvum</i> IIaA20G1R1	D
	<i>C. parvum</i> IIaA22G1R1	J
Tres arroyos	<i>C. parvum</i> IIaA18G1R1	I
	<i>C. parvum</i> IIaA20G1R1	J
Tandil	<i>C. parvum</i> IIaA21G1R1	BEB4

Tabla 3. Distribución de muestras de materia fecal coinfectadas por *Cryptosporidium* y *E. bieneusi* en terneros de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

## DISCUSIÓN

El análisis de las muestras de materia fecal de los animales estudiados, reveló un 41,62% de frecuencia de infección por *Cryptosporidium* spp en la provincia de Buenos Aires. En Argentina, Del Coco *et al.* (2008) han reportado valores del 17% en terneros menores de 30 días de vida localizados en General Mansilla, provincia de Buenos Aires utilizando microscopía óptica como método diagnóstico. De la misma manera, Bellinzoni *et al.* (1990) registraron valores del 29,6% en terneros menores de 1 mes y Tiranti *et al.* (2011) han reportado infección por *Cryptosporidium* spp. en el 19% en bovinos menores de 7 semanas de vida en la provincia de Córdoba, Argentina. Las diferencias en las frecuencias de infección respecto a la presente tesis podrían relacionarse con la mayor sensibilidad y especificidad de la PCR como método diagnóstico. Otros autores utilizando la misma metodología han reportado cifras menores a la del presente estudio en Malasia (Yap *et al.*, 2016), China (Qi *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015), Polonia (Rzezutka & Kaupke, 2013; Kaupke A, Rzezutka, 2015), Japón (Murakoshi *et al.*, 2013); e India (Venu *et al.*, 2012). En China, Zhang *et al.* (2013) y en Estados Unidos, Santín *et al.*, (2004),(2008), han encontrado valores superiores a lo de la presente tesis.

La caracterización molecular de *Cryptosporidium* es imprescindible para poder establecer el riesgo de este parásito para la salud pública, debido a que solo ciertas especies y subtipos del género son zoonóticas y la diseminación de los ooquistes en suelo y aguas en la región pueden ser causa de las infecciones en humanos (Xiao & Ryan, 2008). En el período 2003-2010, un

total de 926 subtipos de *C. parvum* han sido reportados en 14 países (Imre & Dărăbuș, 2011). Las herramientas genéticas que permiten determinar subtipos dentro de la especie *C. parvum* están siendo cada vez más utilizadas con fines epidemiológicos (Xiao, 2010). Distintos targets genéticos han sido y son utilizados para tal fin, incluyendo secuencias de ADN mini y microsatélites, el gen de la glicoproteína 60 (GP60), ARN de doble cadena, o la secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal. La glicoproteína de superficie GP60 se encuentra en estadíos invasivos del parásito y es uno de los blancos de la respuesta inmune (Strong *et al.*, 2000; Waldron & Power, 2011). De acuerdo al subtipo, sería posible relacionar características biológicas del parásito con manifestaciones clínicas en el hospedador (Cama *et al.*, 2007a).

Mientras que *C. parvum* suele afectar a terneros en período de lactancia o menores de 2 meses de vida (Santín *et al.*, 2004a; Fayer *et al.*, 2006; Santín *et al.*, 2008), *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium andersoni* y *C. bovis* suelen ser reportadas en terneros de mayor edad (Feng *et al.*, 2007, Santín & Trout, 2008; Wang *et al.*, 2011). *Cryptosporidium bovis* es la única de las tres especies mencionadas que presenta potencial zoonótico, ya que ha sido aislada en trabajadores rurales en India (Khan *et al.*, 2010). En el presente trabajo esta especie ha sido detectada en un ternero de corta edad que mantenía lactancia artificial, tal como se reportó en estudios realizados en Suecia por Silverlås *et al.*, (2010); en Malasia por Muhid *et al.* (2011) y en Australia por Ng *et al.* (2011).

Los subtipos con potencial zoonotico de la familia Ila fueron los únicos encontrados en la región estudiada. Esta familia de subtipos suele ser la que se halla con mayor frecuencia en terneros a nivel mundial (Jex & Gasser,



2010), tal como fue reportado en países de Europa (Imre & Dărăbuș, 2011), en Estados Unidos (Xiao *et al.*, 2007) y Canadá (Trotz-Williams *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto la diversidad genética de *C. parvum* en terneros de la Cuenca Mar y Sierras de la Provincia de Buenos Aires.

Cinco de los 7 subtipos identificados en este estudio (IIaA18G1R1, IIaA20G1R1, IIaA21G1R1, IIaA22G1R1 y IIaA23G1R1) se han detectado con anterioridad en ganado vacuno en Argentina (Del Coco *et al.*, 2012; Tomazic *et al.*, 2013). En relación a los subtipos IIaA16G1R1 y IIaA19G1R1, es la primera vez que estos han sido encontrados en nuestro país. Los resultados indican una diversidad genética sustancial en Buenos Aires, similar a lo hallado en otros estudios realizados en Suecia (Silverlås *et al.*, 2010, Silverlås & Blanco-Penedo 2013), República Checa (Kváč *et al.*, 2011), Australia (Nolan *et al.*, 2009), o Canadá (Trotz-Williams *et al.*, 2006). Sin embargo, resulta interesante que el subtipo IIaA15G2R1, el cual es hallado con mayor frecuencia en el ganado vacuno a nivel mundial (Feng *et al.*, 2013), no ha sido encontrado en Argentina.

El subtipo más común en este estudio, IIaA20G1R1, se encontró con anterioridad en Serbia y Montenegro (Misic & Abe, 2007), Suecia (Silverlås & Blanco-Penedo, 2013) y Argentina (Tomazic *et al.*, 2013). Pero en ninguno de estos países, el subtipo IIaA20G1R1 resultó el más frecuente, sino que lo fueron el IIaA21G1R1 en Argentina y el IIaA16G1R1 en Serbia y Montenegro y Suecia.

El segundo subtipo más común en este trabajo (IIaA22G1R1) fue el que presentó mayor dispersión geográfica (identificado en 9 de los 12 municipios

estudiados). Este subtipo también se ha informado en Alemania (Broglia *et al.*, 2008), República Checa (Kváč *et al.*, 2011), Suecia (Silverlås & Blanco-Penedo, *et al.*, 2013) y Argentina (Tomazic *et al.*, 2013), aunque en ninguno de estos estudios resultó el más frecuente.

El subtipo IlaA18G1R1 también fue reportado en el ganado vacuno en Suecia (Silverlås *et al.*, 2010, Silverlås & Blanco-Penedo 2013), Hungría (Plutzer & Karanis, 2007), República Checa (Kváč *et al.*, 2011), Inglaterra (Brook *et al.*, 2009), Serbia y Montenegro (Misic & Abe, 2007), Países Bajos (Wielinga *et al.*, 2008), Brasil (Couto *et al.*, 2014) y Argentina (Tomazic *et al.*, 2013). Este subtipo parece tener una amplia gama de hospedadores, ya que también se ha encontrado no sólo en el ganado vacuno, sino en ganado caprino en los Países Bajos (Wielinga *et al.*, 2008) y humanos de Inglaterra (Chalmers *et al.*, 2011). Los subtipos IlaA21G1R1 y IlaA23G1R1 fueron identificados en 10 y 4 de los especímenes en el presente estudio, respectivamente. El subtipo IlaA21G1R1 ha sido reportado en el ganado vacuno de Suecia (Silverlås *et al.*, 2010, 2013) y Argentina (Del Coco *et al.*, 2012). El subtipo IlaA23G1R1 sólo se ha identificado previamente en el ganado vacuno en Argentina (Tomazic *et al.*, 2013).

Este estudio representa el primer reporte de IlaA16G1R1 y IlaA19G1R1 en Argentina, aunque estos subtipos han sido anteriormente encontrados en ganado vacuno y humanos. El subtipo IlaA16G1R1 ha sido informado en ganado vacuno en la República Checa (Ondrácková *et al.*, 2009; Kváč *et al.*, 2011), Hungría (Plutzer & Karanis, 2007), en ganado vacuno y humanos en Eslovenia (Soba & Logar, 2008), ganado ovino y vacuno en Rumania (Imre *et al.*, 2011; 2013), en ganado vacuno de Suecia (Björkman *et al.*, 2015) y en

humanos de Canadá (Iqbal *et al.*, 2015) y México (Utsi *et al.*, 2016). El subtipo IlaA19G1R1 fue informado anteriormente en ganado vacuno en los Países Bajos (Wielinga *et al.*, 2008) e Inglaterra (Brook *et al.*, 2009), humanos en Eslovenia (Soba & Logar, 2008) y ganado ovino en Escocia (Connelly *et al.*, 2013). También ha sido asociado a un brote de criptosporidiosis en humanos en Inglaterra, en donde el mismo subtipo fue detectado en heces de un cordero.

Se encontró una asociación significativa entre subtipos y localidad, lo que posiblemente indique una segregación geográfica de los subtipos de *C. parvum*. Los subtipos IlaA16G1R1, IlaA19G1R1 y IlaA23G1R1 fueron confinados a una única ubicación. Sin embargo, los subtipos más comunes, IlaA22G1R1 y IlaA20G1R1, presentaron la distribución más amplia. Estos fueron encontrados en 9 y 7 de los 12 municipios incluidos en el estudio, respectivamente.

Con respecto al hallazgo de dos subtipos coinfectando una misma muestra, esta situación ya ha sido descrita por Xiao *et al.* (2007) en muestras de material fecal de terneros en Estados Unidos.

*Enterocytozoon bieneusi* se encontró en 9 de las muestras de terneros examinadas, exhibiendo una frecuencia de infección del 4,8% y constituye la primera identificación con posterior caracterización molecular de *E. bieneusi* en Argentina. Los tambos lecheros que resultaron positivos se encuentran en 7 de 12 municipios incluidos en el estudio, cubriendo una amplia zona de la provincia de Buenos Aires. Estos resultados sugieren que los terneros podrían representar una potencial fuente de infección para los seres humanos y otros animales. La frecuencia obtenida en este estudio fue semejante a la reportada

en terneros no destetados (3%) de los Estados Unidos (Fayer *et al.*, 2003) pero menor a la obtenida en terneros destetados en otro estudio en ese mismo lugar (13 %) (Santin *et al.*, 2004b).

El análisis de la secuencia ITS de las muestras estudiadas permitió la identificación de seis genotipos diferentes: D, I, J, BEB4, EbpC y un nuevo genotipo BEB10. Cinco de los 6 genotipos identificados en este estudio han sido encontrados previamente en seres humanos (D, I, J, EbpC, BEB4).

Los dos genotipos más frecuentes, J e I, se consideraban con anterioridad ganado – específicos. Sin embargo, el genotipo J también se ha informado además de en ganado vacuno (Santin & Fayer, 2011) otros hospedadores; cabras (Shi *et al.*, 2016), ciervos (Santín & Fayer 2015), aves (Pirestani *et al.*, 2013; Reetz *et al.*, 2002) y yaks (Ma *et al.*, 2014), y humanos (Zhang *et al.*, 2011). El genotipo I ha sido encontrado además de en terneros (Santin & Fayer, 2011), monos (Karim *et al.*, 2014b), cerdos (Galvan-Díaz *et al.*, 2014), gatos (Karim *et al.*, 2014a), yaks (Ma *et al.*, 2014), ciervos (Santín & Fayer, 2015) y humanos (Zhang *et al.*, 2011). El genotipo BEB4 también fue encontrado además de en ganado vacuno (Santín *et al.*, 2012, da Silva Fiuza *et al.*, 2016), en humanos (Sak *et al.* 2011; Zhang *et al.*, 2011), búfalos (Ma *et al.*, 2014), monos (Karim *et al.*, 2015), cerdos (Zhang *et al.*, 2011). El genotipo D se ha encontrado en ganado vacuno de Corea del Sur (Lee, 2007, 2008), Sudáfrica (Abu Samra *et al.*, 2012 ), Brazil (da Silva Fiuza *et al.*, 2016) y China (Zhao *et al.*, 2015).

En América del Sur, el genotipo D ha sido reportado en Brasil en pollos (da Cunha *et al.*, 2016), ganado vacuno (Da Silva Fiuza *et al.*, 2016) y también se ha encontrado en caballos y humanos de Colombia y Perú, respectivamente

(Sulaiman *et al.*, 2003; Bern *et al.*, 2005; Cama *et al.*, 2007b; Santin *et al.*, 2010). También ha sido detectado en zorros (Zhang *et al.*, 2016), cabras (Shi *et al.*, 2016), mapaches (Zhao *et al.*, 2015), antílopes (Zhao *et al.*, 2015), gorilas (Sak *et al.*, 2014), gatos (Karim *et al.*, 2014) y humanos en Polonia (Kicia *et al.*, 2014).

El genotipo EbpC fue encontrado previamente en humanos (Wang *et al.*, 2013), monos (Karim *et al.*, 2015), cerdos (Wan *et al.*, 2016), terneros (Jiang *et al.*, 2016), ciervos (Zhang *et al.*, 2015), mapaches (Zhao *et al.*, 2015), perros (Li *et al.*, 2015), gatos (Karim *et al.*, 2014), zorros (Zhao *et al.*, 2015) y osos andaluces (Tian *et al.*, 2015).

Un nuevo genotipo, llamado BEB10, fue identificado en un ternero.

Existe siempre la posibilidad que un hospedador sea infectado en un mismo momento por más de una especie parasitaria (Thompson *et al.*, 2008; Baldursson & Karanis, 2011). En relación a la presencia simultánea de *Cryptosporidium* – *Enterocytozoon bieneusi* en una misma muestra, este es el primer estudio en el cual se evidencia esta asociación. Sin embargo, Fayer *et al.* (2012) han detectado infección mixtas con distintas combinaciones de los parásitos por *C. bovis*, *C. ryanae*, *Giardia duodenalis* genotipo E, *Blastocystis*, y *E. bieneusi* genotipo I en vacuno Estados Unidos.

Con respecto a *Blastocystis*, este género parasitario no fue encontrado en ninguna de las muestras analizadas. Los controles positivos corroboraron que la ausencia de *Blastocystis* no se debió a cuestiones metodológicas. Santín *et al.* (2012) and Fayer *et al.* (2012) han encontrado *Blastocystis* en materia fecal proveniente de ganado vacuno mayor a 3 meses de edad. Resulta posible que este parásito afecte a animales de mayor edad, por lo que

se infiere que ésta sería la causa de la ausencia de *Blastocystis* en las muestras estudiadas.

## CONCLUSIONES

La presencia de variantes zoonóticas de subtipos de *C. parvum* en terneros predestetados en el área estudiada sugiere que el ganado vacuno podría jugar un papel importante en la transmisión de la criptosporidiosis humana en la región.

Este estudio demuestra por primera vez la presencia de *E. bieneusi* en el ganado vacuno de Argentina. Cinco de los 6 genotipos identificados en el estudio son zoonóticos y se ha encontrado un nuevo genotipo.

La ausencia de *Blastocystis* indicaría que este parásito afecta a animales de mayor edad por lo que los terneros menores de 2 meses no constituirían reservorios naturales de este parásito en la región estudiada. Se requieren de más estudios en terneros de esta población etaria a fin de esclarecer su papel como reservorio zoonótico.

La presencia en materia fecal de terneros de especies y genotipos con potencial zoonótico de *Cryptosporidium* y *E. bieneusi* sugiere que pueden representar un riesgo para la salud pública a través de la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales.

Los estudios epidemiológicos en materia fecal de humanos que viven en estrecho contacto con los animales de granja en Buenos Aires son necesarios para una mayor comprensión de la epidemiología de estos parásitos.

Los parásitos zoonóticos se mantienen en una variedad de ciclos de transmisión que pueden operar independientemente y no se conocen las circunstancias en las cuales estos ciclos pueden interactuar y resultar en una transferencia zoonótica.

En Argentina, los antecedentes de epidemiología molecular de *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Enterocytozoon* son escasos o nulos, lo cual dificulta conocer la dinámica de transmisión. La caracterización de estos agentes en humanos y animales y la identificación de los factores de riesgo asociados permitirán implementar medidas de prevención y control de estas parasitosis.



## BIBLIOGRAFÍA

Abramovich BL, Lura de Calafell MC, Haye MA, Nepote A, Argañara MF. Detection of *Cryptosporidium* in subterranean drinking water. Rev Argent Microbiol. 1996; 28: 73-7.

Abramovich BL, Gilli MI, Haye MA, Carrera E, Lurá MC, Nepote A, Gómez PA, Vaira S, Contini L. *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. Rev Argent Microbiol. 2001; 3: 167-76.

Abu Samra N, Thompson PN, Jori F, Zhang H, Xiao L. *Enterocytozoon bieneusi* at the wildlife/livestock interface of the Kruger National Park, South Africa. Vet Parasitol. 2012;190(3-4):587-90.

Aznar MN, Stevenson MA, Zarich L, León EA Analysis of cattle movements in Argentina, 2005. Prev Vet Med. 2011; 98: 119-127.

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Res. 2011; 45(20):6603-14.

Bellinzoni RC, Blackhall J, Terzolo HR, Moreira AR, Auza N, Mattion N, Micheo GL, La Torre JL, Scodeller EA. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. Rev Argent Microbiol. 1990;22(3):130-6.

Bern C, Kawai V, Vargas D, Rabke-Verani J, Williamson J, Chavez-Valdez R, Xiao L, Sulaiman I, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Cama V, Moura H, Secor WE, Visvesvara G, Gilman RH. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. *J Infect Dis.* 2005;191(10):1658-64.

Björkman C, Lindström L, Oweson C, Ahola H, Troell K, Axén C. *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology.* 2015;142(8):1108-14.

Brogli A, Reckinger S, Cacció SM, Nöckler K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet Parasitol.* 2008;154(1-2):8-13.

Brook EJ, Anthony Hart C, French NP, Christley RM. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet J.* 2009;179(3):378-82.

Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(5):2595-9.

Cacció SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006;4(3):429-43.

Cama VA, Pearson J, Cabrera L, Pacheco L, Gilman R, Meyer S, Ortega Y, Xiao L. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a child and guinea pigs. J Clin Microbiol. 2007b; 45(8):2708-10.

Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. J Infect Dis. 2007a; 196(5):684-91.

Chalmers RM, Smith RP, Hadfield SJ, Elwin K, Giles M. Zoonotic linkage and variation in *Cryptosporidium parvum* from patients in the United Kingdom. Parasitol Res. 2011;108(5):1321-5.

Connelly L, Craig BH, Jones B, Alexander CL. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of Soay Sheep on St. Kilda Islands, Scotland. Appl Environ Microbiol. 2013;79(7):2240-6.

Córdoba MA, Del Coco VF. *Blastocystis* sp. En: Basualdo JA (Ed). Microbiología Médica. 3º ed. Editorial Atlante. Buenos Aires. En prensa

Couto MC, Lima Mde F, Bomfim TC. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. Acta Trop. 2014;130:117-22.

da Cunha MJ, Cury MC, Santín M. Widespread presence of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in chickens. Vet Parasitol. 2016;217:108-12.

da Silva Fiuza VR, Lopes CW, de Oliveira FC, Fayer R, Santin M. New findings of *Enterocytozoon bieneusi* in beef and dairy cattle in Brazil. Vet Parasitol. 2016;216:46-51.

Decraene V, Lebbad M, Botero-Kleiven S, Gustavsson AM, Löfdahl M. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. Epidemiol Infect. 2012;140(3):519-27.

Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. Cryptosporidiosis: an emerging zoonosis. Rev Argent Microbiol. 2009; 41(3):185-96.

Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. Vet Parasitol. 2008; 158(1-2):31-5.

Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. Criptosporidiosis: an emerging zoonosis. Rev Argent Microbiol. 2009; 41(3):185-96.

Del Coco VF, Córdoba MA, Sidoti A, Santín M, Drut R, Basualdo JA. Experimental infection with *Cryptosporidium parvum* IIaA21G1R1 subtype in immunosuppressed mice. Vet Parasitol. 2012;190(3-4):411-7.

Del Coco VF. Efecto de *Enterococcus faecalis* CECT7121 sobre la viabilidad e infectividad de *Cryptosporidium parvum* en modelo murino. Tesis para optar al título de Dr. en Medicina. Año 2012.

Del Coco VF, Córdoba MA. *Cryptosporidium*. En: Basualdo JA (Ed). Microbiología Médica. 3º ed. Editorial Atlante. Buenos Aires. En prensa.

Del Coco VF, Molina NB, Basualdo JA, Córdoba MA. *Blastocystis*: avances, controversias y desafíos futuros. Enviado para su publicación a Rev Arg Microbiol. 2016

Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet Parasitol. 2004;126(1-2):145-66.

Fayer R, Santín M, Trout JM. First detection of microsporidia in dairy calves in North America. Parasitol Res. 2003;90(5):383-6.

Fayer R, Santín M, Trout JM, Greiner E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. Vet Parasitol. 2006; 135(2):105-12.

Fayer R, Santín M, Dargatz D. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Vet Parasitol.* 2010;170(3-4):187-92.

Fayer R, Santín M, Macarisin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res.* 2012; 111(3): 1349-55.

Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Fayer R, Gatei W, Cama V, Xiao L. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol.* 2007;144(1-2):1-9.

Feng Y, Torres E, Li N, Wang L, Bowman D, Xiao L. Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. *Int J Parasitol.* 2013;43(14):1141-7.

Galván-Díaz AL, Magnet A, Fenoy S, Henriques-Gil N, Haro M, Gordo FP, Millán J, Miró G, del Águila C, Izquierdo F. Microsporidia detection and genotyping study of human pathogenic *E. bienersi* in animals from Spain. *PLoS One.* 2014 ;9(3):e92289.

Haro M, Henriques-Gil N, Fenoy S, Izquierdo F, Alonso F, Del Aguila C. Detection and genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in pigeons. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53 Suppl 1:S58-60.

Holubová N, Sak B, Horčíčková M, Hlásková L, Květoňová D, Menchaca S, McEvoy J, Kváč M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. Parasitol Res. 2016. DOI: 10.1007/s00436-016-4967-8.

Imre K, Lobo LM, Matos O, Popescu C, Genchi C, Dărăbuș G. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections? Vet Parasitol. 2011;181(2-4):321-4.

Imre K Dărăbuș G. Distribution of *Cryptosporidium* species, genotypes and *C. parvum* subtypes in cattle in European countries. Sci Parasitol. 2011; 12(1): 1-9.

Imre K, Luca C, Costache M, Sala C, Morar A, Morariu S, Ilie MS, Imre M, Dărăbuș G. Zoonotic *Cryptosporidium parvum* in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). Vet Parasitol. 2013;191(1-2):119-22.

INDEC, 2010. [www.indec.gov.ar/](http://www.indec.gov.ar/). (ultimo acceso 18.04.16)

Iqbal A, Goldfarb DM, Slinger R, Dixon BR. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in diarrhoeic patients in the Qikiqtani Region, Nunavut, Canada. Int J Circumpolar Health. 2015;74:27713.

Jagai JS, Griffiths JK, Kirshen PH, Webb P, Naumova EN. Patterns of protozoan infections: spatiotemporal associations with cattle density. *Ecohealth*. 2010; 7(1): 33-46.

Jex AR, Gasser RB. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of "next generation" technologies--research review. *Biotechnol Adv*. 2010; 28(1):17-26.

Jiang Y, Tao W, Wan Q, Li Q, Yang Y, Lin Y, Zhang S, Li W. Zoonotic and Potentially Host-Adapted *Enterocytozoon bieneusi* Genotypes in Sheep and Cattle in Northeast China and an Increasing Concern about the Zoonotic Importance of Previously Considered Ruminant-Adapted Genotypes. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(10):3326-35.

Karim MR, Dong H, Yu F, Jian F, Zhang L, Wang R, Zhang S, Rume FI, Ning C, Xiao L. Genetic diversity in *Enterocytozoon bieneusi* isolates from dogs and cats in China: host specificity and public health implications. *J Clin Microbiol*. 2014a;52(9):3297-302.

Karim MR, Wang R, Dong H, Zhang L, Li J, Zhang S, Rume FI, Qi M, Jian F, Sun M, Yang G, Zou F, Ning C, Xiao L. Genetic polymorphism and zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* from nonhuman primates in China. *Appl Environ Microbiol*. 2014b;80(6):1893-8.



Karim MR, Dong H, Li T, Yu F, Li D, Zhang L, Li J, Wang R, Li S, Li X, Rume FI, Ning C. Predomination and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in captive nonhuman primates in zoos in China: high genetic diversity and zoonotic significance.

Kaupke A, Rzeżutka A. Emergence of novel subtypes of *Cryptosporidium parvum* in calves in Poland. Parasitol Res. 2015;114(12):4709-16.

Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. Vet Parasitol. 2010; 171(1-2):41-7.

Kicia M, Wesolowska M, Jakuszko K, Kopacz Z, Sak B, Květonova D, Krajewska M, Kváč M. Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a renal transplant recipient. J Clin Microbiol. 2014;52(5):1780-2.

Kváč M, Hromadová N, Květoňová D, Rost M, Sak B. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. Vet Parasitol. 2011;177(3-4):378-82.

Lee JH. Prevalence and molecular characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Korea. Parasitol Res. 2007;101(2):391-6.

Lee JH. Prevalence and molecular characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Korea. Parasitol Res. 2007;101(2):391-6.

Lee JH. Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. Appl Environ Microbiol. 2008;74(5):1664-6.

Lee JH. Prevalence and molecular characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle in Korea. Parasitol Res. 2007;101(2):391-6.

Ma J, Cai J, Ma J, Feng Y, Xiao L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in yaks (*Bos grunniens*) in China. Vet Parasitol. 2014;202(3-4):113-8.

Ma J, Li P, Zhao X, Xu H, Wu W, Wang Y, Guo Y, Wang L, Feng Y, Xiao L. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. Vet Parasitol. 2015;207(3-4):220-7.

Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, Davis JP. A massive

outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med. 1994; 331:161-7.

Misic Z, Abe N. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. Parasitology. 2007;134(Pt 3):351-8.

Muhid A, Robertson I, Ng J, Ryan U. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. Exp Parasitol. 2011; 127(2):534-8.

Murakoshi F, Tozawa Y, Inomata A, Horimoto T, Wada Y, Kato K. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Ishikari District, Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci. 2013;75(7):837-40.

Ng J, Eastwood K, Durrheim D, Massey P, Walker B, Armson A, Ryan U. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. Exp Parasitol. 2008; 119:192-5.

Ng J, Yang R, McCarthy S, Gordon C, Hijjawi N, Ryan U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. Vet Parasitol. 2011; 176(2-3):145-50.

Nolan MJ, Jex AR, Mansell PD, Browning GF, Gasser RB. Genetic characterization of *Cryptosporidium* parvum from calves by mutation scanning and targeted sequencing--zoonotic implications. Electrophoresis. 2009;30(15):2640-7.

Ondráčková Z, Kvác M, Sak B, Kvetonová D, Rost M. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. Vet Parasitol. 2009;165(1-2):141-4

Pirestani M, Sadraei J, Forouzandeh M. Molecular characterization and genotyping of human related microsporidia in free-ranging and captive pigeons of Tehran, Iran. Infect Genet Evol. 2013 Dec;20:495-9.

Plutzer J, Karanis P. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. Vet Parasitol. 2007;146(3-4):357-62.

Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. Vet Parasitol. 2009;165(3-4):187-99.

Qi M, Wang H, Jing B, Wang D, Wang R, Zhang L. Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Xinjiang, Northwestern China. Vet Parasitol. 2015; 212(3-4):404-7.

Reetz J, Rinder H, Thomschke A, Manke H, Schwebs M, Bruderek A. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). Int J Parasitol. 2002;32(7):785-7.

Ryan U, Xiao L 2015. *Cryptosporidium*, In: Xiao, L., Ryan, U., Feng, Y. (Eds.) Biology of Foodborne Parasites. CRC Press, United States of America, pp. 77-95.

Rzeżutka A, Kaupke A. Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* species isolated from cattle in Poland. Vet Parasitol. 2013;196(3-4):301-6.

Sak B, Brady D, Pelikánová M, Květoňová D, Rost M, Kostka M, Tolarová V, Hůzová Z, Kváč M. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. J Clin Microbiol. 2011;49(3):1064-70.

Sak B, Petrželková KJ, Květoňová D, Mynářová A, Pomajbíková K, Modrý D, Cranfield MR, Mudakikwa A, Kváč M. Diversity of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. PLoS One. 2014;9(11):e109751.

Santín M, Trout JM, Fayer R. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in post-weaned dairy calves in the eastern United States. Parasitol Res. 2004b; 93(4):287-9.

Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet Parasitol. 2004a; 122(2):103-17.

Santín M, Trout JM, Fayer R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet Parasitol. 2008; 155(1-2):15-23.

Santín M, Trout JM. Livestock. En: Fayer R, Xiao L, editores. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2º ed. New York: CRC Press; 2008. p. 451-83.

Santín M, Vecino JA, Fayer R. A zoonotic genotype of *Enterocytozoon bieneusi* in horses. J Parasitol. 2010; 96(1):157-61.

Santín M, Fayer R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. Res Vet Sci. 2011; 90(3): 363-371.

Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. Parasitol Res. 2011; 109(1):205-12.

Santín M, Dargatz D, Fayer R. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in weaned beef calves on cow-calf operations in the USA. *Parasitol Res.* 2012;110(5):2033-41.

Santin M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi*, *Giardia*, and *Cryptosporidium* infecting white-tailed deer. *J Eukaryot Microbiol.* 2015;62(1):34-43.

Shi K, Li M, Wang X, Li J, Karim MR, Wang R, Zhang L, Jian F, Ning C. Molecular survey of *Enterocytozoon bieneusi* in sheep and goats in China. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):23.

Silverlås C, Näslund K, Björkman C, Mattsson JG. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Vet Parasitol.* 2010; 169(3-4):289-95.

Silverlås C, Blanco-Penedo I. *Cryptosporidium* spp. in calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Epidemiol Infect.* 2013;141(3):529-39.

Soba B, Logar J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology.* 2008;135(11):1263-70.

Stensvold CR. Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. *Trop Parasitol.* 2015;5(1):3-5.

Strong WB, Gut J, Nelson RG. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. Infect Immun. 2000; 68(7):4117-34.

Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW 3rd, Xiao L. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. Appl Environ Microbiol. 2003;69(8):4495-501.

Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, Iqbal J, Khalid N, Xiao L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait .J Clin Microbiol. 2005; 43(6):2805-9.

Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Vet J. 2008; 177(1): 18-25.

Thompson RC, Smith A. Zoonotic enteric protozoa. Vet Parasitol. 2011; 182(1): 70-78.

Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol. 2004; 126(1-2): 15-35.



Tiranti K, Larriestra A, Vissio C, Picco N, Alustiza F, Degioanni A, Vivas A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. Rev Bras Parasitol Vet. 2011;20(2):140-7.

Tian GR, Zhao GH, Du SZ, Hu XF, Wang HB, Zhang LX, Yu SK. First report of *Enterocytozoon bieneusi* from giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) and red pandas (*Ailurus fulgens*) in China. Infect Genet Evol. 2015;34:32-5.

Tomazic ML, Maidana J, Dominguez M, Uriarte EL, Galarza R, Garro C, Florin-Christensen M, Schnittger L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. Vet Parasitol. 2013;198(3-4):382-6.

Torgerson PR, MacPherson CN. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. Vet Parasitol. 2011; 182(1):79-95.

Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, Nydam DV, Jamieson F, Xiao L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitol Res. 2006; 99(4):346-52.

Utsi L, Smith SJ, Chalmers RM, Padfield S. Cryptosporidiosis outbreak in visitors of a UK industry-compliant petting farm caused by a rare

*Cryptosporidium parvum* subtype: a case-control study. Epidemiol Infect. 2016;144(5):1000-9.

Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. Blastocystosis: an emerging or re-emerging potential zoonosis? Vet Ital. 2008; 44(4):679-84.

Velásquez JN, Carnevale S, Oelemann WM, Etchart C, Peralta JM. Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* by the polymerase chain reaction in archival fixed duodenal tissue. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005; 23(4):218-20.

Velásquez JN, Carnevale, Bessaso H, Bramajo J, Kuo L, Fainboim H. Identification of *Enterocytozoon bieneusi* in a patient with sclerosing cholangitis and AIDS. Acta Gastroenterol Latinoam. 2000; 30(1):47-51.

Venu R, Latha BR, Basith SA, Raj GD, Sreekumar C, Raman M. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Southern states of India. Vet Parasitol. 2012; 188(1-2):19-24.

Waldron LS, Power ML. Fluorescence analysis detects gp60 subtype diversity in *Cryptosporidium* infections. Infect Genet Evol. 2011; 11(6):1388-95.

Wang R, Ma G, Zhao J, Lu Q, Wang H, Zhang L, Jian F, Ning C, Xiao L. *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitol Int.* 2011; 60(1):1-4.

Wang L, Zhang H, Zhao X, Zhang L, Zhang G, Guo M, Liu L, Feng Y, Xiao L. Zoonotic *Cryptosporidium* species and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in HIV-positive patients on antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):557-63.

Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, van der Giessen JW. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol.* 2008; 38(7):809-17.

Xiao X, Zhou L, Santin M, Yang W, Fayer R. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol Res.* 2007; 100(4):701-6.

Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol.* 2008; 38(11): 1239-1255.

Xiao L, Ryan U. Molecular epidemiology. En: Fayer R, Xiao L, editores. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2º ed. New York: CRC Press; 2008. p. 119-63.

Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*. 2010;124(1):80-9.

Yap NJ, Koehler AV, Ebner J, Tan TK, Lim YA, Gasser RB. Molecular analysis of *Cryptosporidium* from cattle from five states of Peninsular Malaysia. *Mol Cell Probes*. 2016;30(1):39-43.

Zhang X, Wang Z, Su Y, Liang X, Sun X, Peng S, Lu H, Jiang N, Yin J, Xiang M, Chen Q. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in China. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):2006-8.

Zhang W, Wang R, Yang F, Zhang L, Cao J, Zhang X, Ling H, Liu A, Shen Y. Distribution and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in Northeastern China's Heilongjiang Province. *PLoS One*. 2013;8(1):e54857.

Zhang Z, Huang J, Karim MR, Zhao J, Dong H, Ai W, Li F, Zhang L, Wang R. Zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*) in Henan, China. *Exp Parasitol*. 2015;155:46-8.

Zhang XX, Cong W, Lou ZL, Ma JG, Zheng WB, Yao QX, Zhao Q, Zhu XQ. Prevalence, risk factors and multilocus genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in farmed foxes (*Vulpes lagopus*), Northern China. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):72.

Zhao W, Zhang W, Yang F, Zhang L, Wang R, Cao J, Shen Y, Liu A.  
*Enterocytozoon bieneusi* in Dairy Cattle in the Northeast of China: Genetic  
Diversity of ITS Gene and Evaluation of Zoonotic Transmission Potential. J  
Eukaryot Microbiol. 2015;62(4):553-60.



Dra. Mónica Santín Durán  
Directora

Dra. María Alejandra Córdoba  
Co-directora

Dra. Valeria F. Del Coco  
Maestrando